

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05140

研究課題名(和文) タンパク質結晶への異種金属錯体固定化によるカスケード反応触媒の創製

研究課題名(英文) Creation of solid catalyst for cascade reaction by immobilization of metal complexes in the protein crystals

研究代表者

安部 聡 (Abe, Satoshi)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：40508595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞内で形成されるタンパク質結晶を用い、その内部空間に複数の金属錯体や酵素を固定化し、カスケード反応を触媒する人工触媒の創製を目指した。昆虫細胞で結晶化する多角体結晶へPd錯体とIr錯体の固定化を試みた結果、Ir錯体、Pd錯体の順に結晶と反応させた複合体では、ICP-MSの結果、Pd、Ir錯体の存在を確認した。今後は触媒反応活性のための分子設計を行う。一方で、多角体結晶に加水分解酵素であるリパーゼと脱水素酵素であるアルコールデヒドロゲナーゼを内包した結晶を作成し、これらの結晶がカスケード反応を触媒し、固体触媒として高い活性と繰り返し利用可能なことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、極めて高い安定性をもつ多角体結晶を利用し、アミノ酸置換や欠損による触媒活性中心の最適化や基質の取り込み、拡散制御を試み、様々な反応条件下での活性制御が可能な反応場を構築した。また、細胞内で形成されるタンパク質結晶を利用するため、将来的には、細胞内での触媒反応も可能となり、触媒科学だけでなく、生体機能を制御する人工酵素の創製も可能となる。さらに、本研究で使用した多角体結晶は、細胞内で酵素の内包を完結し、乾燥や熱に対して高い安定性をもつため、タンパク質精製の高速化やタンパク質の長期保存と放出活性化など、生体機能材料の合成に止まらず、医薬品開発などへも応用可能な分子技術である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we constructed artificial enzymes that catalyze cascade reactions by immobilizing multiple metal complexes and enzymes in the internal space of protein crystals formed in living cells. We have prepared the polyhedra crystals immobilizing Pd and Ir complexes. The ICP-MS result indicated that Pd and Ir complexes were immobilized in the crystals. Molecular design for catalytic reaction activity will be carried out in the future. We have constructed the 38-amino acid deletion mutants, which forms interlinked hollow nanocages with a diameter of 5 nm in the crystals. The mutant crystal can encapsulate lipase and alcohol dehydrogenase. The composite crystal enhances the reactivity of the cascade reaction. The higher reactivity is because of the substrate and intermediate efficiently diffusing through the extended channels designed within the nanoporous crystal.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：タンパク質結晶 多角体 人工酵素 固体触媒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、有機金属錯体とタンパク質を複合化した人工金属酵素の開発が盛んに行われている。金属錯体の高い反応性とタンパク質の高い選択性の両者の優れたところを組み合わせることにより、天然酵素ではできない反応を可能とする。しかしながら、従来の人工金属酵素の研究は、タンパク質空間へ単一の金属錯体を固定化することによる反応評価にとどまっておき、多段階反応の触媒を可能とする複数種類の金属錯体の反応制御には至っていない。

申請者は、これまでカゴ型タンパク質フェリチン 24 量体からなる内径 8nm の孤立空間を用い、アミノ酸残基への配位固定化による有機金属錯体の反応制御法を確立してきた。近年では、2 種類の金属錯体を一つのカゴ型空間に固定化することによるカスケード反応触媒を構築した。これらの成果から、有機金属錯体は、タンパク質内部空間のヒスチジンやシステインなど特定のアミノ酸残基に配位結合し、周辺のアミノ酸側鎖の柔軟な構造が反応中心の安定化と活性制御に重要な役割を果たすことを見出してきた。しかしながら、依然として、これらの人工金属酵素は、利用可能な反応溶液や pH に制限が多く、分子触媒を凌駕する高効率な反応触媒の開発には至っておらず、多段階反応を可能とする様々な反応条件に適用可能な高い安定性をもつタンパク質担持材料を利用した触媒設計が求められている。申請者は、タンパク質空間内での触媒化学を固体のタンパク質集積体であるタンパク質結晶に適用し、安定化のために化学架橋したりゾチーム結晶の一次元細孔空間への有機金属錯体の集積による不斉触媒の創製を進めてきた。

そこで、本研究では、極めて高い安定性をもつタンパク質結晶である「多角体」(図 1) を利用し、複数の金属錯体固定化によるカスケード反応固体触媒を創製する。多角体は、細胞内で産生されるタンパク質の結晶であり、化学架橋することなく、広範囲な pH (2-10)、有機溶媒、乾燥、凍結に対し、結晶性を維持する高い安定性を示すことから、申請者は、これまで、酵素を

多角体結晶は、1-5 μ m サイズであり、三量体がビルディングブロックとなり結晶を形成

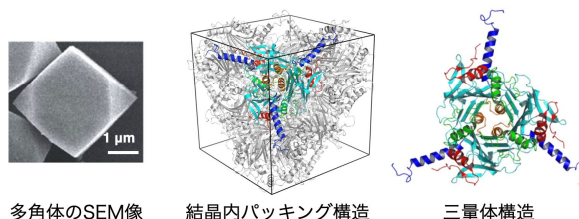


図 1. 多角体結晶

内包した多角体結晶の乾燥保存と結晶溶解による酵素放出制御、結晶内部への金属錯体の固定化を報告し、多角体結晶の固体材料として有用性を示してきた。さらに、多角体タンパク質の分子間に存在するアミノ酸側鎖を欠損させることにより、結晶内に細孔空間を拡大し、外来分子の拡散や吸着を制御することに成功した。これらの結果から多角体は、金属錯体から酵素まで様々なサイズを集積できる安定性と設計性を合わせもつことを見出した。そこで、本研究では、多角体内部の分子設計により、複数の金属触媒や酵素を固定化する反応場を結晶内部に構築し、アミノ酸置換やアミノ酸欠損による異種触媒活性部位の三次元配置を精密に制御し、カスケード反応を触媒する固体触媒を創製する。

2. 研究の目的

本研究では、2 種類の触媒活性中心を内包するタンパク質結晶を作成し、結晶内部で反応を触媒する固体材料の創成を行う。本手法を実現するために、細胞内で結晶化する「多角体」を用いて、Pd 錯体と Ir 錯体の固定化と 2 種類の酵素、リパーゼとアルコールデヒドロゲナーゼの固定化と触媒反応を試みた。まず、(1) IrCp*、Pd(allyl)錯体錯体の固定化手法の確立、(2) 反応活性制御のための多角体分子設計、(3) 2 種類酵素固定化によるカスケード反応触媒活性制御を行なった。

3. 研究の方法

(1) IrCp*, Pd(allyl)錯体の結晶内固定化

多角体結晶へ Pd(allyl)錯体と IrCp*錯体の固定化を試みた。固定化方法として、Ir 錯体、Pd 錯体の順に集積する方法と Pd 錯体、Ir 錯体の順に固定化する方法、2つの金属錯体を同時に集積する方法について検討した。

(2) 反応活性制御のための多角体分子設計

多角体結晶での基質の拡散や酵素の固定化を促進させるため、多角体モノマーの 38 残基を欠損した変異体を作成した。得られた変異体結晶は、SEM、結晶構造解析などで同定した。

(3) 2種類酵素固定化によるカスケード反応触媒活性制御

リパーゼとアルコールデヒドロゲナーゼの 2 種類の酵素を細胞内で多角体タンパク質と共発現することにより、酵素を内包した結晶を合成した。酵素には、結晶内への固定化を促進させるために、多角体タンパク質の N 末端構造である H1 ヘリックスを導入した。合成した酵素内包結晶は SEM で形状を観察した。結晶内での酵素の固定化数は、結晶を溶解した後に ELISA 法により定量を行なった。酵素活性は、7-(3,4-Diacetoxybutyloxy)04-methyl-2H-chromen-2-one を用いて、加水分解反応と脱水素化反応のカスケード反応を試みた。

4. 研究成果

(1) IrCp*, Pd(allyl)錯体の金属錯体の固定化手法の確立

Ir錯体、Pd錯体の順に反応させた結晶では、結晶の色の変化が観察され、ICP-MSの結果、Pd、Ir錯体の結晶内での存在を確認した。しかしながら、Pd錯体のPd錯体の反応時にIr錯体の固定化量が減少してしまった。また、複合体の結晶構造解析を行なったところ、Ir錯体に由来する電子密度は観測されなかった。L4ループの3残基を欠損した変異体を用いたときのみ、Pdの結合サイトが観察された。したがって、今後、2種類の金属錯体を固定化させる、反応条件の検討が必要不可欠である。

(2) 反応活性制御のための多角体分子設計

酵素活性や酵素の固定化量の向上のため、多角体タンパク質の Ala67-Ala104 の計 38 残基のアミノ酸を欠損した変異体 (38PhC) を設計し、昆虫細胞で発現したところ、野生型と同様に cubic 状の結晶が形成された。MALDI TOF MS による分子量測定の結果、目的の部位が欠損した変異体が合成されていることを確認した。結晶構造解析の結果、1.95Å での構造解析に成功し、野生型と同じ空間群であり、欠損領域以外はほとんど野生型と変わっていないことがわかった。集積構造では、ユニットセルの中心領域が欠損のため、空洞になっていることが明らかとなった。また、この空洞が連結しており、基質の拡散が促進されると期待される (図 2)。

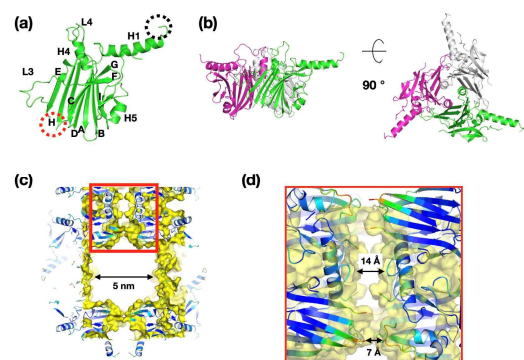


図 2. 38 の結晶構造 (a) 単量体構造、(b) 3 量体構造、(c) (d) 集積構造とチャンネル構造、

(3) 2種類酵素固定化によるカスケード反応触媒活性制御

H1 ヘリックスを融合したリパーゼ (H1-CALB)、アルコールデヒドロゲナーゼ (H1-ADH) を多角体タンパク質と昆虫細胞で共発現し結晶を作成したところ、多角体結晶と同様に cubic 状の結晶が形成された。酵素の固定化量は、38 残基欠損した変異体が野生型より 5 倍ほど酵素を固定化することがわかった。この複合結晶を用いて加水分解反応と脱水素化反応のカスケード反応を行なった結果、野生型結晶やフリーの酵素と比較して、1.9 倍、3.8 倍高い効率で反応が進

行する。この高い反応性は、結晶内に形成された拡張チャンネルを通して、基質と中間体が効率よく拡散するためだと考えられる。

これらの結果から、細胞内タンパク質結晶は、高い設計性と安定性をもつため、機能性の固体材料として広く利用可能だと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Abe Satoshi, Pham Thuc Toan, Negishi Hashiru, Yamashita Keitaro, Hirata Kunio, Ueno Takafumi	4. 巻 60
2. 論文標題 Design of an In Cell Protein Crystal for the Environmentally Responsive Construction of a Supramolecular Filament	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 12341-12345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202102039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nguyen Tien K., Abe Satoshi, Kasamatsu Makoto, Maity Basudev, Yamashita Keitaro, Hirata Kunio, Kojima Mariko, Ueno Takafumi	4. 巻 4
2. 論文標題 In-Cell Engineering of Protein Crystals with Nanoporous Structures for Promoting Cascade Reactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Nano Materials	6. 最初と最後の頁 1672 ~ 1681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsnm.0c03129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Yoshihito, Aiba Yuichiro, Ariyasu Shinya, Abe Satoshi	4. 巻 93
2. 論文標題 Molecular Design and Regulation of Metalloenzyme Activities through Two Novel Approaches: Ferritin and P450s	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 379 ~ 392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20190305	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yuki Hishikawa, Basudev Maity, Nozomi Ito, Satoshi Abe, Diannan Lu, Takafumi Ueno.	4. 巻 49
2. 論文標題 Design of Multinuclear Gold Binding Site at the Two-fold Symmetric Interface of the Ferritin Cage.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.200217	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Abe Satoshi, Ito Nozomi, Maity Basudev, Lu Chenlin, Lu Diannan, Ueno Takafumi	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Coordination design of cadmium ions at the 4-fold axis channel of the apo-ferritin cage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dalton Transactions	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9DT00609E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計24件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Mariko Kojima, Yuki Hishikawa, Satoshi Abe, Tadaomi Furuta, Duy Phuoc Tran, Akio Kitao, Takafumi Ueno
2. 発表標題 Energy Analysis of Miniprotein by in Vivo Protein Crystallization
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安部 聡
2. 発表標題 細胞内結晶工学によるタンパク質結晶の機能化
3. 学会等名 令和2年度 日本化学会東北支部 秋田地区講演会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中潤子, 安部聡, 長田俊哉, 上野隆史
2. 発表標題 GPCR 内包を目指したタンパク質ハイブリッド結晶の構築
3. 学会等名 第10回 CSJ 化学フェスタ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安部 聡, 小島摩利子, 上野隆史
2. 発表標題 タンパク質の迅速結晶化とサブミクロン結晶の構造解析
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 PHAM Toan Thuc, 安部 聡, 根岸 走, 上野 隆史
2. 発表標題 Construction of Fibril Protein Assemblies From Engineered Protein Crystals
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mariko Kojima, Satoshi Abe, Takafumi Ueno
2. 発表標題 In vivo Protein Crystal Engineering for Structure Analysis of Meta-stable State Mini-protein
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安部 聡, 小島摩利子, 小暮遼河, 上野隆史
2. 発表標題 細胞内タンパク質結晶化の最適化と迅速構造解析
3. 学会等名 第14回バイオ関連シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小島摩利子, 安部聡, 上野隆史
2. 発表標題 無細胞タンパク質合成による微小結晶構造解析
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Thuc Toan PHAM, Satoshi Abe, Hashiru Negishi, Takafumi Ueno
2. 発表標題 Construction of Filament Protein Assembly From Autonomous Cross-Linked Crystals
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小島摩利子, 安部聡, 上野隆史
2. 発表標題 ミニタンパク質融合多角体タンパク質の細胞内結晶化
3. 学会等名 日本化学会 第100春季年会 (2020)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小暮遼河, 安部 聡, 上野隆史
2. 発表標題 細胞内結晶化の最適化
3. 学会等名 日本化学会 第100春季年会 (2020)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Thuc Toan PHAM, Satoshi Abe, Hashiru Negishi, Takafumi Ueno
2. 発表標題 Construction of Fibril Protein Assembly From Protein Crystals
3. 学会等名 The 100th CSJ Annual Meeting
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安部 聡, 小島摩利子, 小暮遼河, 上野隆史
2. 発表標題 タンパク質の迅速構造解析を目指した多角体の結晶化設計
3. 学会等名 日本化学会 第100春季年会 (2020)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Satoshi Abe
2. 発表標題 Design of Biohybrid Materials by in cell Crystal Engineering
3. 学会等名 Pre-symposium of The 1st International Symposium on Molecular Engine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安部 聡, 上野隆史
2. 発表標題 外来タンパク質固定化のための細胞内タンパク質結晶の空間設計
3. 学会等名 日本結晶学会令和元年 (2019年度) 年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小島摩利子, 安部聡, 上野隆史
2. 発表標題 ミニタンパク質融合多角体タンパク質の結晶設計
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安部 聡, 小島摩利子, 上野隆史
2. 発表標題 多角体タンパク質の結晶化設計
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Abe, Takafumi Ueno
2. 発表標題 In Cell Protein Crystals Containing Organometallic Complexes
3. 学会等名 15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mariko Kojima, Satoshi Abe, Takafumi Ueno
2. 発表標題 In vivo crystallization of polyhedra protein fused with metal binding peptide ”
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Abe, Makoto Kasamatsu, Takafumi Ueno
2. 発表標題 Creation of functional materials using in vivo protein crystals
3. 学会等名 第68回高分子年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tien Khanh Nguyen, Satoshi Abe, Takafumi Ueno
2. 発表標題 Solid-biocatalysts constructed from immobilized enzymes within in vivo protein crystals
3. 学会等名 13th Biofunctioned conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tien Khanh Nguyen, Satoshi Abe, Takafumi Ueno
2. 発表標題 Solid biocatalysts designed from in vivo protein crystals
3. 学会等名 68th Symposium on Macromolecules
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安部 聡、厚見晃平、笠松誠、上野隆史
2. 発表標題 多角体タンパク質の細胞内結晶化と機能創成
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Abe and Takafumi Ueno
2. 発表標題 In cell protein crystals containing organometallic complexes
3. 学会等名 ICCC2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 安部 聡、上野隆史	4. 発行年 2020年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 32-38
3. 書名 光エネルギー変換における分子触媒の新展開	

1. 著者名 安部 聡、上野隆史	4. 発行年 2020年
2. 出版社 三共出版	5. 総ページ数 324-342
3. 書名 機能性高分子金属錯体	

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 タンパク質固体材料の製造	発明者 上野隆史、安部 聡、ティエン カー ン ニュエン	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-034011	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 タンパク質結晶の製造方法及び結晶構造解析方法	発明者 上野隆史、安部 聡、小島摩利子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-027386	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 タンパク質固体材料の製造	発明者 上野隆史、安部 聡、小島摩利子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-145456	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

東京工業大学 上野研究室
<http://www.ueno.bio.titech.ac.jp>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------